

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
7 juillet 2005 (07.07.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2005/061552 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**C08B 37/10**, A61K 9/10, 9/14, 47/36

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2004/003285

(22) Date de dépôt international :  
17 décembre 2004 (17.12.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0315003 19 décembre 2003 (19.12.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **ETHY-PHARM** [FR/FR]; 21, rue St-Mathieu, F-78550 Houdan (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **HOARAU, Didier** [FR/CA]; 5716, rue Saint Urbain, Montreal, Quebec H2T 2X3 (CA). **BOUSTTA, Mahfoud** [FR/FR]; 9, rue des Casernes, F-34570 Pignan (FR). **BRAUD, Christian** [FR/FR]; 4, rue du Maréchal Bernadotte, F-34170 Castelnau Le Lez (FR). **VERT, Michel** [FR/FR]; 8, rue du Maréchal-Lefebvre, F-34170 Castelnau le Lez (FR).

(74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (US).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: AMPHIPHILIC HEPARIN DERIVATIVE FORMED BY COUPLING A HEPARIN WITH A BILE ACID

(54) Titre : DERIVE AMPHIPHILE D'HEPARINE FORME PAR COUPLAGE DE L'HEPARINE AVEC UN ACIDE BILIAIRE

(57) Abstract: The invention relates to an amphiphilic heparin derivative formed from at least one type of partially N-desulfated heparin and at least one type of bile acid comprising one or several bile acid molecules grafted on a heparin molecule by an amide bond formed between the terminal carboxylic acid function of a bile acid and a primary heparin amine function which is initially present in the heparin or resulting from the N-desulphation. The inventive derivative is characterised in that the number of grafted bile acid molecules per 100 heparin disaccharide units ranges from 15 to 80 approximately.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un dérivé amphiphile d'héparine formé à partir d'une héparine au moins partiellement N-désulfatée et d'au moins un acide biliaire, comprenant une ou plusieurs molécules d'acide biliaire greffées sur la molécule d'héparine par une liaison amide formée entre la fonction acide carboxylique terminale de l'acide biliaire et une fonction amine primaire de l'héparine, originellement présente dans l'héparine ou résultant de la N-désulfatation, caractérisé en ce que le nombre de molécules d'acide biliaire greffées pour 100 unités disaccharidiques de l'héparine est compris entre environ 15 et environ 80.

WO 2005/061552 A1

**Dérivé amphiphile d'héparine formé par couplage de l'héparine avec un  
acide biliaire**

La présente invention concerne un dérivé amphiphile d'héparine formé par couplage de l'héparine avec un acide biliaire, ayant la capacité de former des nanoparticules de façon spontanée en milieu aqueux.

Les nanoparticules formées à partir de ce dérivé d'héparine peuvent être utilisées comme vecteur de principes actifs pour une administration par voie orale.

Elles permettent notamment de solubiliser et de véhiculer des principes actifs hydrophobes à travers le mucus intestinal jusqu'au contact étroit de la muqueuse intestinale, de libérer lesdits principes actifs de manière progressive et d'en promouvoir l'absorption.

La présente invention concerne en outre le procédé de synthèse de ce dérivé amphiphile d'héparine.

La présente invention concerne enfin les utilisations qui peuvent être faites d'un tel vecteur, en particulier dans le domaine thérapeutique pour l'administration de principes actifs par voie orale, et plus particulièrement comme vecteur de principes actifs faiblement absorbés par la muqueuse intestinale. La présente invention concerne également l'utilisation dudit vecteur selon l'invention pour le transport de principes actifs en association avec un support galénique classique utilisé pour l'administration de principes actifs par voie orale tel que des granules, des microgranules, des gélules ou des solutions buvables notamment.

On entend par hydrophobe tout composé insoluble dans l'eau ou très peu affiné pour l'eau, et par amphiphile tout composé présentant à la fois une certaine affinité pour les phases aqueuses et une certaine affinité pour les phases organiques.

En outre, on désigne sous le nom de nanoparticule toute particule de taille inférieure ou égale au micromètre, et sous celui de microparticule, toute particule de taille comprise entre 1 et 1000  $\mu\text{m}$ .

On entend par promotion de l'absorption, tout moyen susceptible d'être mis en œuvre afin d'augmenter la quantité de principe actif qui traverse la muqueuse intestinale.

Le mucus est un produit clair et filant de sécrétion normale des glandes muqueuses dont la mucine est la principale constituante et qui contient de l'eau, des sels et des cellules desquamées. Il joue un rôle protecteur vis-à-vis des muqueuses qu'il recouvre, tant du point de vue mécanique que du point de vue chimique.

5 Les acides biliaires sont des dérivés du cholestérol fabriqués par le foie et sécrétés dans la bile où ils sont stockés. Ils permettent de maintenir le cholestérol sous forme soluble. Lorsque la bile parvient dans l'intestin grêle après un repas, ces acides biliaires vont favoriser la solubilisation, l'homogénéisation l'émulsification (dissolution) et l'absorption des graisses provenant des aliments.

10 On distingue les acides biliaires primaires (par exemple, l'acide cholique et l'acide chénodéoxycholique) et les acides biliaires secondaires (par exemple, l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique).

Enfin, on entend par biodisponibilité, la fraction de molécule de principe actif retrouvée dans la circulation après une administration par voie orale. La  
15 biodisponibilité est mesurée en évaluant le taux plasmatique du principe actif observé comparé au taux plasmatique de ce même principe actif administré par voie intraveineuse.

Une partie importante des principes actifs thérapeutiques administrés par voie orale est absorbée au niveau de l'intestin grêle, et plus particulièrement dans la partie  
20 haute de l'intestin grêle : le duodénum. Cette absorption implique dans un premier temps le passage de la molécule de principe actif au travers de la membrane plasmique des cellules de l'épithélium intestinal, les entérocytes, puis la traversée de l'endothélium vasculaire des vaisseaux sanguins.

Une telle absorption est dépendante de nombreux paramètres qui influent sur  
25 l'efficacité d'absorption du principe actif considéré et plus particulièrement sur le franchissement de la muqueuse intestinale. Cependant, trois paramètres principaux doivent être considérés pour expliquer la faible biodisponibilité de certains principes actifs administrés par voie orale.

Tout d'abord, la solubilité du principe actif dans le milieu gastro-intestinal est  
30 parfois réduite, voire nulle pour certains principes actifs de nature particulièrement hydrophobe.

En effet, on peut considérer le milieu gastro-intestinal comme un milieu principalement aqueux, puisque composé en partie par le chyme et en partie par les sucs gastriques. De ce fait, l'administration par voie orale de ces principes actifs n'est pas possible s'ils n'ont pas au préalable fait l'objet d'une dispersion très fine ou  
5 d'une dissolution dans une phase organique constituée par l'assemblage des parties hydrophobes d'une micelle de tensioactifs ou du cœur d'une nanoparticule.

Par ailleurs, certains principes actifs, bien qu'hydrosolubles, font l'objet d'une "fenêtre d'absorption", c'est à dire que leur absorption n'est possible qu'au niveau d'une zone définie de l'intestin, telle que le duodénum par exemple. Là encore  
10 l'association de ces principes actifs à un transporteur ou vecteur, qui présente une affinité pour la muqueuse intestinale, permet d'augmenter le temps de résidence de ces composés dans un environnement proche de leur site d'absorption.

Enfin, le principe actif doit présenter, en milieu gastro-intestinal, donc aqueux, une structure externe qui lui permette d'approcher la membrane intestinale  
15 pour pouvoir être absorbé par les entérocytes. En effet, les cellules épithéliales de l'intestin et plus particulièrement du duodénum sont couvertes d'un mucus dense constitué par un enchevêtrement de glycoprotéines. Ce réseau moléculaire constitue une barrière physique de type gel hydrophile que les molécules de principes actifs hydrophobes doivent franchir pour être en contact avec la membrane plasmique des  
20 entérocytes (Larhed *et al.* 1997). Ainsi, la molécule de principe actif, seule ou en association avec un vecteur, doit présenter une configuration physique lui permettant d'approcher cette membrane. En particulier, deux types de contraintes existent à ce niveau : des contraintes de taille et des contraintes de charge. En effet, le principe actif ou le complexe vecteur/principe actif doit avoir une taille suffisamment petite  
25 (inférieure au micromètre) lui permettant de diffuser au sein du réseau de glycoprotéines. En outre, certains auteurs comme Park et Robinson (1984) ont constaté que le phénomène de bioadhésion au mucus gastro-intestinal était amélioré pour des molécules présentant des charges de surface, comparativement à des molécules non chargées.

30 La constitution de vecteurs pour des principes actifs faiblement absorbés par la muqueuse intestinale doit donc permettre de réduire l'influence de ces paramètres

pour favoriser le franchissement du principe actif à travers la barrière intestinale et donc la biodisponibilité de ces composés.

Ainsi, de tels vecteurs devront pouvoir, non seulement véhiculer les principes actifs jusqu'à leur site spécifique d'absorption intestinal, mais également favoriser  
5 leur solubilité dans le milieu gastro-intestinal et / ou augmenter leur temps de transit intestinal.

La présente invention se propose donc de fournir un nouveau type de vecteur destiné à améliorer l'absorption de principes actifs présentant une faible biodisponibilité par voie orale, c'est à dire étant peu ou pas absorbés par la muqueuse  
10 intestinale.

Parmi l'ensemble des vecteurs existant, l'utilisation de vecteurs sous forme de microparticules ou nanoparticules chargées en principes actifs permet d'envisager le transport de composés faiblement solubles.

Ainsi, des vésicules de type liposome ont été développées dans le but de  
15 transporter de tels composés. Ces nanoparticules sont constituées par une membrane composée d'une double couche de phospholipides, dont les surfaces internes et externes sont hydrophiles, laquelle membrane délimite en son sein un compartiment aqueux. Les liposomes permettent ainsi de véhiculer des principes actifs hydrosolubles incorporés au sein de cette cavité centrale.

20 Le document WO 9308802 décrit par exemple des liposomes destinés au transport et à la libération de principes actifs de type immunosuppresseurs tricycliques. De tels liposomes permettent un transport stable de ces principes actifs dans différents milieux aqueux et notamment les liquides physiologiques, tout en maintenant la stabilité des principes actifs dans des solutions injectables telles que les  
25 solutions de glucose par exemple.

Cependant ce type de vecteur présente deux inconvénients majeurs. Tout d'abord, la stabilité des liposomes dans le milieu digestif est faible. En effet, ces structures peuvent être facilement déstabilisées par les tensioactifs tels que les sels biliaires. Par ailleurs, les lipides constituant ces vecteurs sont rapidement dégradés,  
30 notamment par les enzymes digestives, telles que les lipases, ce qui réduit l'efficacité d'absorption du principe actif.

Le brevet JP58049311 divulgue un moyen de résoudre le problème de l'instabilité des liposomes en greffant à leur surface des esters d'acides gras de polysaccharides. Ces "polysaccharide-coated-liposome" ont alors une stabilité plasmatique nettement augmentée et donc une durée de vie plus importante dans la circulation sanguine.

Par ailleurs, le document JP 61268628 permet le ciblage du principe actif sur son site d'absorption en greffant à la surface des liposomes transporteurs des polysaccharides sur lesquels sont fixés des anticorps monoclonaux spécifiques du site d'absorption visé. L'utilisation par voie orale de ces liposomes stabilisés par des polysaccharides estérifiés par des acides gras n'a pas été envisagée. Cependant, ce type de vecteur liposomal présente l'inconvénient de ne pouvoir transporter que des molécules de nature majoritairement hydrophile, et donc d'être peu adapté au transport de molécules lipophiles, naturellement peu solubles en milieu aqueux. Par ailleurs, leur utilisation dans les liquides gastro-intestinaux est impossible en raison de leur sensibilité aux lipases intestinales et aux sels biliaires. Enfin, le ciblage du site d'absorption nécessite une étape complexe de greffage d'anticorps spécifiques. Cette étape rend le procédé de synthèse de ces liposomes long et délicat puisqu'il faut préalablement produire, puis coupler lesdits anticorps aux polysaccharides avant de les fixer à la surface des liposomes.

Les travaux effectués sur les polymères saccharidiques modifiés utilisés comme stabilisateurs de liposomes ont permis de découvrir que de tels polysaccharides hydrophobisés avaient la capacité de s'auto-agréger sous forme d'amas présentant un cœur hydrophobe, constitué par le rassemblement des unités hydrophobes greffées, et une surface hydrophile, constituée par le squelette du polymère saccharidique (Akiyoshi *et al.* 1993).

Ainsi, des systèmes vecteurs de principes actifs sur ce modèle ont été employés. Le brevet WO 9842755 décrit en effet des vecteurs de médicaments consistant en des vésicules formées à partir de dérivés de polysaccharides. Ces dérivés du Chitosane, du Pullulane ou du Dextrane comportent au moins un résidu monosaccharidique substitué par un composé hydrophile non ionique et au moins un résidu monosaccharidique substitué par un groupement hydrophobe. Ce groupement hydrophobe est de type alkyl, alkenyl, alkynyl ou acyl à longue chaîne. La formation

des vésicules est ensuite induite en présence de cholestérol. En raison de l'hydrophobisation du squelette polymère hydrophile, le complexe précipite dans l'eau et nécessite la présence de cholestérol et/ou d'un stabilisateur stérique afin d'obtenir le vecteur sous forme vésiculaire. Dans ce modèle, la formation vésiculaire  
5 est induite, ce qui implique une étape de formulation supplémentaire afin de déclencher le passage sous forme particulière.

En revanche, dans le document US 4,997,819, un polysaccharide hydrophobisé est utilisé comme stabilisateur d'émulsions d'acides gras. Les vésicules grasses formées sont utilisées dans le but d'englober diverses substances  
10 lipophiles et notamment des principes actifs. Le polysaccharide préférentiellement employé dans ce cas est le Pullulane, et les groupements hydrophobes utilisés pour hydrophobiser ce polymère sont le cholestérol ou certains acides gras. Le complexe dénommé CHP pour l'abréviation de Cholestérol-Pullulane est le complexe préférentiellement utilisé. Le nombre de groupements hydrophobes greffés sur le  
15 polysaccharide est variable. Dans ce document le polymère modifié n'est pas le composant majoritaire à l'origine des particules lipidiques formées, il n'en constitue qu'un stabilisateur.

D'autres travaux sur des molécules apparentées aux CHP ont conduit à l'utilisation de ces amas multimoléculaires comme vecteurs de principes actifs. En  
20 effet, ces complexes se forment spontanément en milieu aqueux et se présentent sous la forme de nanoparticules présentant plusieurs domaines hydrophobes internes au sein desquels peut être introduit un composé de nature hydrophobe.

Le brevet JP 7097333 décrit ainsi un complexe supramoléculaire composé d'un polysaccharide hydrophobisé destiné à servir de transporteur pour certaines  
25 cytokines. Ce complexe correspond à l'association de résidus de type stérol, préférentiellement le cholestérol à une molécule polysaccharidique, préférentiellement le Pullulane. Le greffage du résidu hydrophobe se fait dans ce cas par l'intermédiaire d'un bras espaceur. Ce type de transporteur est utilisé pour augmenter la durée de vie plasmatique de ces principes actifs administrés par voie  
30 intramusculaire ou percutanée.

Ainsi, ces vésicules permettent d'encapsuler des principes actifs liposolubles dissous au sein de leurs domaines internes hydrophobes. Ces polymères

hydrophobisés présentent donc un intérêt important pour l'administration de tels composés.

Cependant, de tels types de vecteurs ne permettent pas le transport de principes actifs au niveau de leur site d'absorption sur la muqueuse intestinale.

5 Par ailleurs, de tels vecteurs ne permettent pas l'amélioration de l'absorption intestinale des principes actifs qu'ils véhiculent.

Un autre polymère saccharidique, l'héparine, est capable de former des agrégats en milieu aqueux si on greffe sur sa chaîne saccharidique certains résidus hydrophobes. On peut par exemple coupler l'héparine au dodécanal, à l'acide  
10 cholique ou à l'acide stéarique après une N-désulfatation partielle. (F. Diancourt et al.). L'étude montre que sous cette forme hydrophobisée, l'héparine conserve toute son activité biologique, notamment son activité anti-coagulante après administration par voie intraveineuse ou par voir sous-cutanée. Toutefois, dans cette étude, l'héparine n'est pas employée comme vecteur de principes actifs, mais comme  
15 principe actif elle-même. L'objectif de cette étude est de faire passer l'héparine à travers la muqueuse intestinale et de vérifier si elle conserve ses propriétés anti-coagulantes après avoir été hydrophobisée par différents résidus hydrophobes.

La présente invention a pour but de fournir un nouveau type de vecteur de principes actifs qui d'ordinaire sont faiblement ou mal absorbés par la muqueuse  
20 intestinale, ledit vecteur permettant d'augmenter spécifiquement cette absorption en véhiculant les principes actifs à travers le mucus intestinal, puis en les libérant progressivement au contact étroit de la paroi intestinale, mais sans que le vecteur ne traverse cette paroi. Le vecteur selon l'invention se propose également de solubiliser des principes actifs de nature hydrophobe, tout en étant de conception simple,  
25 n'incluant que des éléments constitutifs dérivés de métabolites ou prométabolites digestibles et pouvant être chargé en principe actif facilement.

La présente invention se propose de fournir par ailleurs un vecteur de principes actifs non toxique et biocompatible, ayant la capacité de passer spontanément en milieu aqueux sous forme de nanoparticules d'un diamètre moyen  
30 inférieur au micromètre. Lesdites nanoparticules étant à la fois stables dans le temps, beaucoup plus stables que des liposomes et autres associations micellaires d'amphiphiles, y compris les micelles de copolymères amphiphiles di-blocs, et



capables de libérer progressivement leur contenu au contact de la membrane intestinale. Cette capacité à s'approcher étroitement de la membrane intestinale étant due à leur structure amphiphile particulière combinant des éléments constitutifs chargés et des éléments lipophiles, leur permet de diffuser aisément au sein du réseau  
5 de glycoprotéines que constitue le mucus intestinal.

Par ailleurs, les nanoparticules selon l'invention présentent l'avantage d'augmenter significativement le temps de résidence du principe actif transporté puisqu'elles interagissent favorablement avec les glycoprotéines du mucus intestinal voire s'y déstabilisent pour libérer l'actif localement par suite d'interactions avec les  
10 macromolécules constituant le mucus. Cette interaction résultant d'un phénomène de mucoadhésion prolongé, favorise l'absorption des principes actifs, en particulier pour ceux qui présentent une "fenêtre" d'absorption.

On peut ainsi envisager notamment, le transport de médicaments présentant un certain caractère hydrophobe tels que ceux appartenant à la classe des anti-  
15 inflammatoires, des antifongiques, des inhibiteurs des canaux calciques ou des anticancéreux par exemple. Plus particulièrement, on pourra prévoir le transport de principes actifs tels que la nifédipine, la progestérone, la carbamazépine ou l'itraconazole.

En outre, la présente invention présente l'avantage d'être simple à élaborer et  
20 peu coûteuse, étant composée exclusivement de molécules naturelles facilement disponibles et assemblées entre elles par des réactions chimiques simples.

Enfin, le vecteur de principes actifs conforme à l'invention peut être facilement associé ou incorporé au sein d'un support galénique classique utilisé pour l'administration par voie orale de médicaments. En effet, on peut prévoir d'incorporer  
25 au sein de comprimés, de granules, ou encore de poudre, de gélules ou de solution buvable, les nanoparticules conformes à l'invention, préalablement chargées en principe actif considéré et purifiées. Un tel vecteur peut donc rentrer de façon simple dans la composition de médicaments destinés à être administrés par voie orale.

Les particules de petite taille (micro et nanoparticules) arrivant au contact de  
30 la muqueuse intestinale vont présenter trois types de destinées, étroitement liées à leur taille et à leur nature chimique. Ces particules peuvent tout d'abord être capturées par le tissu lymphoïde associé à l'intestin, selon un phénomène

d'endocytose au niveau des cellules des plaques de Peyer. Par ailleurs, ces particules peuvent également être retenues au niveau du mucus par un phénomène de mucoadhésion. Enfin, ces particules peuvent être directement éliminées dans les matières fécales.

5 Plusieurs auteurs ont ainsi constaté que les particules de taille supérieure au micromètre étaient facilement éliminées au cours du transit intestinal, du fait de leur faible taux de pénétration au sein du mucus intestinal (Ponchel *et al.* 1997). Le réseau muqueux est en effet trop dense pour que des particules d'une telle taille puissent y diffuser.

10 Par ailleurs, le phénomène d'endocytose observé au niveau du tissu lymphoïde est un phénomène qui concerne plus particulièrement les particules présentant une surface non chargée et de nature hydrophobe (Desai *et al.* 1996; O'Hagan 1996; Florence 1997). L'étendue de ce phénomène d'endocytose est toutefois minime étant donné que les plaques de Peyer ne représentent qu'une surface  
15 infime de la surface totale de la muqueuse intestinale.

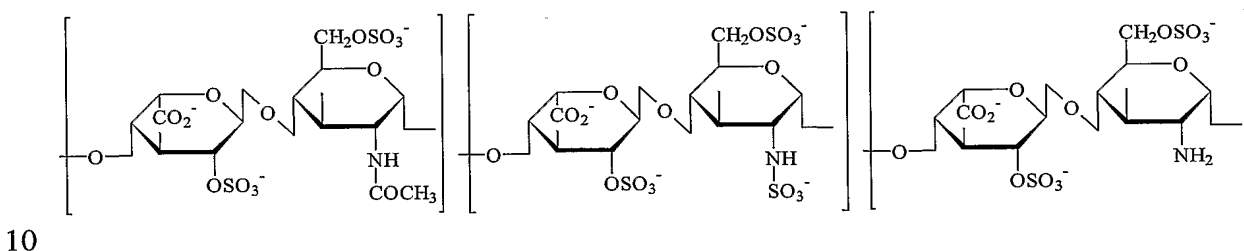
Le vecteur de principes actifs conforme à la présente invention est constitué par l'assemblage spontané en milieu aqueux de plusieurs molécules d'héparine sur lesquelles on a greffé au moins un résidu hydrophobe dérivé d'au moins un acide biliaire de façon à réaliser un polymère de nature amphiphile.

20 Ce polymère permet de favoriser au maximum le phénomène de mucoadhésion des nanoparticules formées conformément à la présente invention tout en créant un vecteur capable de transporter sous forme dissoute un principe actif lipophile. Ainsi, le vecteur de principes actifs conforme à l'invention répond à plusieurs critères de taille et de structure qui lui permettent d'être particulièrement  
25 adapté à l'environnement de l'intestin.

La présente invention a pour objet un dérivé amphiphile d'héparine formé à partir d'une héparine au moins partiellement N-désulfatée et d'au moins un acide biliaire, comprenant une ou plusieurs molécules d'acide biliaire greffées sur la molécule d'héparine par une liaison amide formée entre la fonction acide  
30 carboxylique terminale de l'acide biliaire et une fonction amine primaire de l'héparine, originellement présente dans l'héparine ou résultant de la N-désulfatation, dans lequel le nombre de molécules d'acide biliaire greffées pour 100 unités

disaccharidiques de l'héparine est compris entre environ 15 et environ 80, de préférence entre environ 20 et environ 60.

L'héparine est une macromolécule complexe constituée d'un assemblage d'unités saccharidiques de la classe des glycosaminoglycannes. La chaîne polymère est majoritairement constituée d'un sucre acide (acide uronique) et d'un sucre aminé (glucosamine) disposés en alternance régulière. Le motif disaccharidique correspondant est multisulfaté en des positions bien définies. Les fonctions acide sont sous forme carboxylate et sulfate. Les trois principaux motifs de l'héparine peuvent être représentés de la façon suivante :

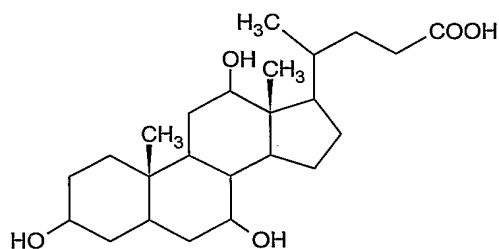


L'azote du sucre aminé est essentiellement sous la forme N-sulfate (dans plus de 80% des motifs), mais peut être également sous la forme N-acétyl (environ 15% des motifs) ; les motifs comprenant la forme amine libre sont très peu représentés (1 à 2% en extrémité de chaîne). Les fonctions amine qui sont principalement sous la forme N-sulfate ne sont pas disponibles pour les réactions chimiques de couplage. Il est donc préférable de disposer d'héparine ayant de nombreuses fonctions amine primaire sur lesquelles le couplage de groupements hydrophobes pourra être réalisé. Dans la présente invention, il s'agit d'une réaction d'amidification : la fonction acide carboxylique de l'acide biliaire va devoir réagir avec la fonction amine du polymère pour former une liaison amide.

L'héparine constitue donc un polyélectrolyte essentiellement chargé négativement par des groupements sulfate ( $\text{O-SO}_3^-$  ou  $\text{NH-SO}_3^-$ ) et carboxylate ( $\text{COO}^-$ ) à l'état naturel.

L'acide biliaire est avantageusement choisi parmi l'acide cholique, l'acide désoxycholique, l'acide lithocholique, l'acide cholanique et l'acide chénodésoxycholique, ainsi que leurs mélanges.

Par exemple, l'acide cholique a la formule chimique suivante :



5 L'acide cholique, qui entre dans la composition des sels biliaires, est un stéroïde dérivé du cholestérol de nature majoritairement hydrophobe.

Cependant, les fonctions hydroxyles portées par ce résidu confèrent à la molécule d'acide cholique une certaine hydrophilicité. Les groupements hydrophiles portés par l'acide cholique diminuent la force d'agrégation des groupements hydrophobes entre eux. De ce fait, le cœur lipophile de ces complexes  
10 supramoléculaires va donc être plus lâche que s'il avait été constitué uniquement de résidus de cholestérol par exemple (qui est une molécule nettement moins hydrophile). Ce phénomène va contribuer à augmenter le diamètre des nanoparticules formées par l'assemblage de ces complexes et également déterminer l'affinité des principes actifs pour les domaines hydrophobes.

15 Le dérivé amphiphile d'héparine objet de la présente invention peut être avantageusement préparé sous forme de sel de calcium, de magnésium ou de sodium.

La présente invention a aussi pour objet les nanoparticules pouvant être formées à partir du dérivé amphiphile d'héparine tel que précédemment défini.

Les dérivés amphiphiles d'héparine conformes à l'invention ont en effet la  
20 capacité de s'assembler en milieu aqueux pour former une suspension colloïdale stable de nanoparticules d'un diamètre compris entre 10 nanomètres et 1 micromètre. Le diamètre moyen observé étant cependant particulièrement homogène, de l'ordre de 300 nanomètres.

25 Les nanoparticules objets de la présente invention présentent une surface externe hydrophile et un ou plusieurs domaines internes hydrophobes.

En milieu aqueux, les résidus hydrophobes du polymère se rapprochent et forment des points de réticulation non covalents, qui sont à l'origine de la formation des nanoparticules amphiphiles, permettant la constitution de domaines internes

hydrophobes au sein desquels des principes actifs lipophiles peuvent être dissous et donc transportés.

Les héparines hydrophobisées par l'acide biliaire présentent un comportement en solution aqueuse différent de celui de l'héparine native. Plus le polymère est hydrophobisé et plus il est difficilement soluble dans l'eau. Les solutions aqueuses sont opalescentes et stables. Ces solutions se colorent en orange après l'ajout de Yellow OB, un marqueur lipophile qui colore les solutions en orange lorsqu'il est solubilisé dans une phase organique. La coloration orange permet alors de prouver la présence de domaines hydrophobes dans la molécule synthétisée conformément à la présente invention, puisque ce marqueur ne se dissout ni dans l'eau ni dans une solution d'héparine non hydrophobisée.

La présente invention a aussi pour objet lesdites nanoparticules contenant en outre un ou plusieurs principes actifs hydrophobes dissous dans leurs domaines internes hydrophobes.

Lesdits principes actifs portent de préférence un ou plusieurs groupements polaires.

Ils sont de préférence choisis parmi les anti-inflammatoires, les antifongiques, les inhibiteurs des canaux calciques et les anti-cancéreux.

La présente invention a également pour objet lesdites nanoparticules en tant que vecteurs de principes actifs pouvant être administré par voie orale.

La présente invention a aussi pour objet lesdites nanoparticules en tant que vecteurs de principes actifs permettant d'augmenter l'absorption de ceux-ci par la muqueuse intestinale, et/ou permettant la libération progressive de ceux-ci au niveau de la muqueuse intestinale.

En effet, les nanoparticules objets de la présente invention ont la propriété de pouvoir atteindre et également rester au contact ou dans un environnement proche de la membrane intestinale. Le dérivé amphiphile d'héparine objet de la présente invention possède toutes les qualités nécessaires à une bonne diffusion au sein du mucus et à une bonne muco-adhésion.

Ainsi, les groupements chargés portés par le vecteur conforme à l'invention interagissant favorablement avec les groupements portés par les glycoprotéines du mucus, permettent d'augmenter leur temps de transit au contact de la muqueuse

intestinale en diffusant au sein du réseau des glycoprotéines du mucus. Cette potentialisation du phénomène de muco-adhésion, en augmentant le temps de contact du principe actif avec la membrane intestinale, favorise son absorption.

Le choix de l'héparine comme squelette polysaccharidique est donc  
5 primordial puisque ce polymère présente à la fois de nombreuses fonctions ionisées en milieu aqueux (polyélectrolyte à forte densité de charge) et également des fonctions amine primaire qui vont pouvoir être facilement libérées, rendant possible le couplage du résidu hydrophobe. La forte densité de charge assure la solubilité du système à l'état colloïdal suite au couplage de nombreux résidus hydrophobes, lui  
10 évitant une précipitation massive dans les milieux aqueux. La formation des nanoparticules se fait par auto assemblage spontané dans les milieux aqueux et ne nécessite pas l'ajout de tensioactifs ou d'agents de stabilisation stérique. Enfin, l'héparine a avantageusement été choisie car elle constitue un polymère naturel absolument bien toléré par l'organisme, et d'ailleurs couramment utilisé, par voie  
15 parentérale, en thérapie chez l'homme comme agent anti-coagulant.

Le choix d'un acide biliaire comme agent hydrophobisant est également une des caractéristiques essentielles de l'invention puisque ce composé naturel va permettre au polymère modifié de s'assembler sous forme de nanoparticules stables dans le milieu intestinal mais également de réaliser des interactions intermoléculaires  
20 qui assurent non seulement la cohésion du système mais la solubilisation de principes actifs de nature hydrophobe. Ces interactions non covalentes permettent par la suite de libérer le contenu en principes actifs des nanoparticules au voisinage des membranes lipidiques des cellules intestinales.

Ainsi, l'association de l'héparine avec au moins un acide biliaire permet la  
25 constitution de nanoparticules suffisamment stables dans l'environnement intestinal pour rester intactes jusqu'au contact étroit de la muqueuse intestinale. Cependant, les nanoparticules conformes à l'invention sont suffisamment labiles et biodégradables pour libérer ensuite progressivement le principe actif qu'elles contiennent dans l'environnement muqueux à proximité de la membrane lipidique des cellules  
30 intestinales, sans traverser la muqueuse intestinale.

Les nanoparticules objets de la présente invention présentent de nombreuses propriétés avantageuses en terme de taille, de stabilité et de capacité d'incorporation de principes actifs.

La présente invention a également pour objet la suspension colloïdale en milieu aqueux contenant lesdites nanoparticules. Cette suspension peut par exemple être utilisée pour préparer une suspension buvable ou bien être pulvérisée sur des supports neutres pour préparer des granules.

La présente invention a également pour objet la composition pharmaceutique comprenant lesdites nanoparticules associées à au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Dans cette composition pharmaceutique, l'excipient est avantageusement choisi pour permettre une administration de principes actifs par voie orale.

Ladite composition pharmaceutique peut se présenter sous forme de granules, microgranules, comprimés, gélules ou solutions buvables.

La présente invention a également pour objet le procédé de préparation du dérivé amphiphile d'héparine, qui comprend la N-désulfatation au moins partielle d'une héparine, puis une étape de couplage qui consiste à faire réagir au moins une fonction amine primaire de l'héparine, originellement présente ou résultant de la N-désulfatation, avec la fonction acide carboxylique terminale, éventuellement sous forme activée, d'au moins un acide biliaire.

La préparation des nanoparticules peut être suivie d'une étape de lyophilisation pour pouvoir les conserver plus facilement.

Le principe actif peut être incorporé dans les nanoparticules par dissolution directe sous agitation, par dialyse, par émulsion huile/eau, ou par évaporation de solvant.

### **Procédé de préparation**

Comme expliqué précédemment, il est préférable de disposer d'héparine ayant de nombreuses fonctions amine primaire sur lesquelles le couplage des groupements hydrophobes pourra être réalisé.

La libération des fonctions amine primaire va se faire par une hydrolyse sélective des fonctions N-Sulfate selon une méthode permettant de contrôler précisément le taux de N-Désulfatation.

De préférence, cette étape est suivie d'une étape de formation d'un sel de  
5 cétyltriméthylammonium de la molécule de polysaccharide désulfatée, de manière à lui conférer une solubilité en milieu organique, avant d'appliquer la méthode de couplage des résidus acide cholique sur les fonctions amine libérées. Ce sel est par la suite éliminé à la fin de l'étape de couplage.

#### 10 a) N-Désulfatation

La désulfatation est de préférence sélective sur les groupes N-sulfates de manière à ne pas hydrolyser les O-sulfates ce qui se traduirait par une diminution du nombre de groupements ionisés et donc une perte de solubilité.

Deux méthodes peuvent être employées : l'hydrolyse par autocatalyse de  
15 l'acide héparinique qui correspond à la méthode traditionnellement utilisée et l'hydrolyse en milieu solvant ou "solvolysé" de l'acide héparinique.

Le principal inconvénient de l'hydrolyse par autocatalyse est le temps nécessaire à l'obtention de produits ayant des degrés de N-Désulfatation acceptables. En effet, une telle réaction prend entre une semaine et un mois.

20 En revanche, la solvolysé permet d'obtenir en quelques heures des dérivés d'héparine à forte proportion en fonctions amine primaire. En particulier, cette méthode permet, pour des paramètres de concentration et de température fixés, d'obtenir de façon reproductible des dérivés ayant la teneur en fonction amine primaire désirée, en arrêtant la réaction d'hydrolyse à un temps donné.

25 Selon cette méthode, l'hydrolyse sélective des groupements N-sulfate peut être obtenue en plaçant de l'acide héparinique salifié par de la pyridine dans un mélange de DMSO et d'eau (ou DMSO/méthanol) dont la proportion en eau ne dépasse pas 10%. Dans ces conditions, il est possible d'obtenir des échantillons partiellement ou totalement N-désulfatés, sans entraîner de dépolymérisation ou  
30 d'altération de la structure (Nagasawa et Inoue 1974; Inoue et Nagasawa 1976). La vitesse de cette réaction peut être contrôlée par la température pour une concentration



en héparine donnée. Ainsi, en arrêtant la réaction à différents temps, on obtient en quelques heures des échantillons avec les degrés de N-désulfatation désirés.

Les unités disaccharidiques de la molécule d'héparine sont sous la forme N-sulfate pour un peu plus de 80 % d'entre elles. De préférence, pour la réalisation de la présente invention, la molécule d'héparine est désulfatée à un taux compris entre 10 et 65 %. Ce taux permet d'obtenir un taux compris entre 8 à 52 % des unités disaccharidiques sous la forme N-Désulfatée, c'est à dire sous la forme adéquate à l'étape de couplage du résidu hydrophobe, et plus particulièrement de l'acide biliaire.

La N-désulfatation peut être réalisée de la façon suivante.

On procède tout d'abord à la purification de l'héparine par dialyse (ou ultrafiltration). Puis, la solution d'héparine est percolée à 4°C sur une résine échangeuse de cations sous forme  $H^+$ . On obtient alors une solution d'acide héparinique. On procède alors à l'ajustement de la concentration de la solution obtenue de telle sorte que la proportion en eau résiduelle représente 5% du volume total final lorsque le DMSO sera rajouté. Ainsi, la solution d'acide héparinique peut être lyophilisée après l'étape de concentration ou concentrée à sec avant de rajouter la quantité d'eau voulue. La solution est alors transférée dans un ballon de grand volume pour la réaction. A la solution précédemment obtenue on rajoute une quantité suffisante de pyridine représentant autant d'équivalents que de fonctions acide. Ces fonctions sont alors sous la forme d'un sel de pyridinium. On procède alors au rajout d'un volume de DMSO jusqu'à atteindre la concentration suivante : DMSO/H<sub>2</sub>O (95/5 v/v). La concentration en héparine dans la solution est de 2% (m/v). Cette solution est ensuite portée de façon préférentielle à 40°C, mais on peut également se placer à différentes températures en fonction de la vitesse d'hydrolyse que l'on souhaite avoir). Des prélèvements sont effectués à différents temps.

Chaque prélèvement est mis dans un bain de glace et on y ajoute de l'eau sous agitation (la réaction est en effet inhibée par une proportion en eau supérieure à 25%). Le milieu est alors neutralisé avec une quantité suffisante de soude jusqu'à atteindre pH 7-8.

Il existe alors deux alternatives selon que l'on veut isoler le produit obtenu ou réaliser directement un sel avec du bromure de cétyl triméthylammonium :

Dans le cas de l'isolement de l'héparine N-désulfatée sous forme de sel de sodium :

L'héparine N-désulfatée se trouve dans une solution comprenant des ions sulfate libérés, des sels de pyridinium, du DMSO. La solution est mise à dialyser  
5 plusieurs fois contre de l'eau de façon à éliminer ces impuretés, puis elle subit une étape de concentration et enfin, une étape de lyophilisation. On obtient donc de l'héparine N-désulfatée purifiée, sous forme sèche dont on peut alors déterminer le pourcentage de N-désulfatation.

10 Dans le cas de l'obtention directe du sel d'ammonium quaternaire :

Après prélèvement et neutralisation, on ajoute une solution de bromure de cétyl triméthylammonium. Ce dernier composé forme un sel insoluble avec l'héparine qui précipite en milieu aqueux. Il est alors séparé par filtration, et rincé  
15 plusieurs fois à l'eau chaude de manière à éliminer les ions sulfate et les autres molécules solubles dans l'eau. Le produit est ensuite séché. Il peut être par la suite employé pour l'étape de couplage.

Le choix de la température se fait en fonction de ce que l'on souhaite obtenir et du contrôle de la réaction. Ainsi, en se plaçant à 20°C on contrôle plus facilement l'obtention d'héparines faiblement N-désulfatées alors qu'à 40°C la vitesse  
20 d'hydrolyse est trop rapide au départ, ce qui ne convient pas pour récupérer des héparines faiblement N-désulfatées mais plutôt pour des héparines ayant 20 à 60% de N-désulfatation. En se plaçant à une température supérieure ou égale à 50°C on obtient en 24 heures un échantillon totalement N-désulfaté.

Préférentiellement, on utilisera pour la réalisation de nanoparticules  
25 conformes à la présente invention et bien adaptées au transport de principes actifs, des héparines hydrophobisées comportant un taux de N-Désulfatation compris entre 8 et 65 %.

**b) Méthode de dosage des fonctions amine primaire de l'héparine N-désulfatée non hydrophobisée**  
30

Cette méthode est basée sur la méthode colorimétrique de dosage des amines développée par Snyder et Sobocinski (1975). Le dosage est basé sur la détermination

de la densité optique à la longueur d'onde de 420 nm du chromophore formé par la liaison covalente de l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) aux fonctions amine libres. Etant donné que le TNBS en milieu basique se dégrade au fur et à mesure selon une cinétique linéaire d'ordre 0 et libère de l'acide picrique qui  
5 interfère à 420 nm avec le chromophore formé, des blancs (sans héparine) sont également réalisés. Cette réaction est spécifique des groupements  $\text{NH}_2$ .

Le mode opératoire peut être le suivant :

- Réalisation de solutions d'héparine N-désulfatée, par exemple conformément à la méthode décrite, dans du tampon borate 0,1M à pH 10, et  
10 répartition de 500  $\mu\text{l}$  dans des tubes
- Ajout de 500  $\mu\text{l}$  d'une solution de TNBS 0,08M (diluée dans de l'eau distillée) dans tous les tubes.
- Prélèvement d'aliqots à différents temps. Dilution et mesure de la Densité Optique (DO) à 420 nm.
- 15 • On obtient des profils cinétiques d'ordre 0 pour les blancs (échantillons sans héparine) et de pseudo-ordre 1 pour les échantillons contenant de l'héparine
- Les taux de N-désulfatation sont déterminés en prenant en compte les paramètres cinétiques des échantillons (extrapolation des courbes et détermination  
20 des paramètres pour une réaction à 100% d'achèvement) et les valeurs données par le standard à 100% de N-désulfatation, comme dans l'exemple 1.

La méthode ci-dessus s'applique à des échantillons d'héparines N-désulfatées non-hydrophobisées sous la forme de sel de sodium (et non sous la forme de sel de cetyltriméthylammonium).

25

### c) Couplage de l'acide cholique

Les fonctions amine primaire ( $-\text{NH}_2$ ) libérées sur l'héparine vont intervenir dans une réaction de couplage avec la fonction acide carboxylique ( $-\text{COOH}$ ) des molécules d'acide biliaire pour conduire à la formation d'une liaison covalente de  
30 type amide ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ). Cette réaction est réalisée de préférence avec activation du

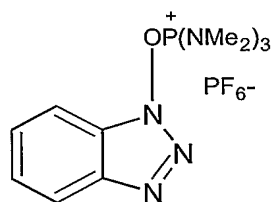
groupe carbonyle de l'acide cholique, étant donné que la fonction amine primaire est peu réactive.

En effet, le carbone de la fonction acide carboxylique (COOH) n'est pas suffisamment électrophile pour pouvoir être attaqué par le doublet électronique de l'atome d'azote. Pour rendre le carbone plus électrophile, on travaille habituellement avec des chlorures d'acyle ( $R-CO-Cl$ ) ou des anhydrides d'acide ( $R-CO-O-CO-R$ ) par exemple. Une autre façon est de passer par des complexes activés. La chimie des groupements activateurs est ainsi très employée dans la synthèse peptidique. Dans le cadre de la présente invention, on emploie de préférence un agent de couplage pour activer la fonction carboxylique terminale de l'acide biliaire.

L'agent de couplage utilisé pour activer la fonction carboxylique terminale de l'acide biliaire est de préférence choisi parmi l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxy-tris(diméthylamino)phosphonium (BOP), l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium (PyBOP) et le hexafluorophosphate de bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium (PyBroP).

Par exemple, le BOP comprend un bon groupement nucléofuge (groupement partant), l'HOBt (1-hydroxybenzotriazole), qui présente l'avantage d'accélérer la réaction de couplage et de supprimer les réactions parasites ; le sel oxyphosphonium constitue la partie "agent de couplage" et se lie au carboxylate pour activer le carbonyle (Evin 1978).

La formule chimique du BOP est la suivante :



Dans la méthode mise au point conformément à l'invention, l'agent de couplage permet d'obtenir le polysaccharide hydrophobisé en une seule étape et évite ainsi d'avoir à synthétiser et à isoler au préalable un ester activé de l'acide cholique qui sont deux étapes longues et coûteuses.

La réaction de couplage entre l'héparine N-désulfatée et l'acide biliaire s'effectue de préférence en milieu organique. L'héparine est un polymère très

fortement ionisé et est donc très soluble dans l'eau mais insoluble dans les solvants organiques. Le bromure de cétyl triméthylammonium présente une longue chaîne hydrocarbonée de 16 atomes de carbone et a des propriétés tensioactives en raison de sa tête polaire cationique (ammonium quaternaire) qui lui confère sa solubilité dans l'eau. Lorsque l'on verse une solution de ce composé dans une solution d'héparine, les ions sodium de l'héparine sont alors déplacés et un sel se forme entre les fonctions acide et les fonctions ammonium. Le sel hydrophobe de l'héparine ainsi obtenu précipite instantanément puisqu'il est insoluble dans l'eau. L'héparine sous la forme sel de cétyl triméthylammonium est alors soluble dans les solvants organiques.

La méthode employée peut être la suivante, si on prend l'exemple d'un couplage avec l'acide cholique.

Tout d'abord, il convient de laisser dissoudre à chaud dans du chloroforme à 60°C le sel de cétyl triméthylammonium de l'héparine désulfatée et réaliser pendant ce temps les étapes suivantes :

- introduire dans un petit ballon l'acide cholique, et le solubiliser avec du Diméthyl formamide (DMF)
- rajouter 1,2 équivalents (par rapport à l'acide) d'une amine tertiaire : la N,N-diisopropyléthylamine (DIEA)
- rajouter un équivalent de BOP et chauffer sous agitation pendant quelques minutes jusqu'à ce que tout le BOP soit dissous
- mettre 0,8 équivalent de DIEA dans le ballon contenant l'héparine
- rajouter le contenu du petit ballon (acide cholique) dans le ballon contenant l'héparine et rajouter 0,3 équivalent de BOP
- laisser le tout sous agitation pendant au moins une nuit à 60°C puis évaporer tout le chloroforme
- verser de l'éther pour initier la précipitation du polymère et triturer dans l'éther.
- laisser sous agitation dans l'éther jusqu'à ce que les agglomérats se désagrègent en poudre fine
- filtrer et rincer à l'éther, on obtient le produit brut : héparine couplée par de l'acide cholique mais toujours sous forme de sel de cétyl triméthylammonium

Traitement du brut

- reprendre avec de l'éthanol à chaud (rajouter un peu de DMSO au besoin)
- le produit brut doit être entièrement solubilisé
- 5      • sous agitation et à chaud, rajouter une solution saturée de chlorure de calcium dans de l'éthanol, l'héparine hydrophobisée précipite. Cette opération permet de déplacer le sel de cétyl triméthylammonium
- transvaser le produit précipité dans des tubes pour centrifugation
- triturer dans de l'éthanol chaud, centrifuger. Répéter cette opération de
- 10 rinçage à l'éthanol 4 à 5 fois. Cette opération permet de se débarrasser du chlorure de cétyl triméthylammonium qui est soluble dans l'éthanol chaud
- rejoindre les culots en les reprenant par du DMSO chaud
- purification par dialyses successives contre : DMSO/Ethanol à chaud, éthanol, DMSO/Ethanol, éthanol, DMSO, eau, eau plusieurs fois. A la fin, la solution
- 15 est blanche (translucide à opaque)
- concentration puis lyophilisation. On obtient l'héparine hydrophobisée sous forme de sel de calcium.

Il est possible d'obtenir des héparines hydrophobisées avec d'autres contre-ions que le calcium. En effet, la demanderesse a obtenu également des formes avec le

20 magnésium et le sodium. Or on ne peut pas se débarrasser correctement du sel de cétyl triméthylammonium de l'héparine lors du traitement du brut avec du chlorure de sodium. La demanderesse a ainsi remarqué que la réaction était totale lorsqu'un cation bivalent ( $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Mg}^{++}$ ) est employé.

25      Obtention de la forme magnésium :

Le brut issu du couplage est traité avec une solution saturée de chlorure de magnésium dans de l'éthanol (à la place du chlorure de calcium) puis subit un traitement identique à celui décrit ci-dessus.

Obtention de la forme sodium :

On part du produit final héparine hydrophobisée sous forme de sel de calcium que l'on solubilise dans de l'eau. On y rajoute du tampon phosphate pH 7,4 : le calcium se lie aux ions phosphate pour former un précipité insoluble de phosphate de calcium. L'héparine hydrophobisée est alors sous forme sodique.

Le taux de couplage préféré est celui permettant d'obtenir une héparine où le nombre de molécules d'acide biliaire greffées pour 100 unités disaccharidiques de l'héparine est compris entre environ 15 et environ 80, de préférence entre environ 20 et environ 60.

Avec l'emploi d'un agent permettant d'activer la fonction carboxylique de l'acide biliaire, on peut atteindre en général un taux d'amidification compris entre 80% et 95%.

Le taux de couplage (ou le nombre de molécules d'acide biliaire greffées pour 100 unités disaccharidiques de l'héparine) peut être calculé par la détermination du taux de  $\text{NH}_2$  résiduels sur une héparine hydrophobisée conforme à l'invention.

Pour cela, il faut au préalable, sur un échantillon plus conséquent, réaliser le couplage de TNBS sur tous les  $\text{NH}_2$  de l'héparine (on travaille avec une plus forte concentration en TNBS). Ensuite on élimine par dialyse l'acide picrique et le tampon borate, puis on réalise une étape de concentration et de lyophilisation. Le taux de  $\text{NH}_2$  résiduels est déterminé par mesure de la densité optique à 420 nm d'une solution de l'héparine hydrophobisée couplée au TNBS.

**d) Procédé d'incorporation de principes actifs dans les nanoparticules d'héparine hydrophobisée**

L'incorporation de principes actifs dans le vecteur constitué par les nanoparticules d'héparine hydrophobisée conformes à l'invention a été réalisée par dissolution directe.

Un exemple de méthode d'incorporation par dissolution directe est décrit ci-après.

On introduit dans un tube 30 mg d'héparine hydrophobisée auxquels on ajoute 3 ml d'eau distillée. Après dissolution, on introduit dans le mélange un large excès de principe actif (15 à 30 mg).

Une phase d'agitation du mélange obtenu est réalisée au moyen d'un barreau magnétique pendant plusieurs jours. Le mélange est ensuite centrifugé et le surnageant est passé sur un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$ . La quantité de principe actif solubilisée dans les solutions d'héparine hydrophobisée peuvent être déterminées par spectroscopie UV/Visible ou par HPLC.

Mais on peut également incorporer le principe actif dans les nanoparticules par dialyse, émulsion huile/eau, ou évaporation de solvant.

### **FIGURES**

**Figure 1** : Evolution des blancs (échantillons sans héparine) au cours d'un dosage des fonctions amine par le TNBS.

**Figure 2** : Cinétique de la réaction de dosage des fonctions amines pour une héparine N-désulfatée à 100 % par le TNBS (valeurs expérimentales et valeurs calculées).

**Figure 3** : Incorporation de Carbamazépine dans l'héparine et HEP<sub>19</sub>CHO sous forme de sel de calcium (Cp = 8 mg/ml) après 3 jours.

**Figures 4 et 5** : Incorporation de Carbamazépine (CBZ), Nifédipine (NIF) et Itraconazole (ITR) dans HEP<sub>19</sub>CHO (Cp = 8,6 mg/ml) après 6 jours. **Figure 4** : Concentrations en principe actif dans l'eau et dans les domaines hydrophobes. **Figure 5** : coefficient de partage entre les domaines hydrophobes et la phase aqueuse.

**Figure 6** : Incorporation de Nifédipine dans divers échantillons d'héparines modifiées (Cp # 8 mg/ml) après 4 jours. Influence du degré d'hydrophobisation et de la nature du contre-ion.

**Figure 7** : Absorption de Nifédipine par le sac intestinal éversé durant 90 minutes. Effet de la vectorisation par l'héparine hydrophobisée (HEP30CHO) par rapport à une solution témoin de Nifédipine (eau/DMSO).



## **EXEMPLES**

### **Exemple 1 : Détermination du pourcentage de N-désulfatation de deux échantillons d'héparine hydrophobisée.**

#### **5 Méthode de dosage au TNBS**

On réalise des solutions d'héparine N-désulfatée dans du tampon borate TB ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0,1 M, pH 10) (on calcule les quantités à mettre en œuvre pour avoir *a priori* environ 1,6 à 2,4 mM de  $\text{NH}_2$ ). La solution de TNBS est diluée dans l'eau de manière à obtenir une concentration de 0,08 M. Les solutions sont réparties dans des tubes ; chaque échantillon d'héparine est dupliqué avec un échantillon auquel on applique un facteur de dilution de 0,75 (Tableau 1).

**Tableau 1 : Répartition pour dosage des amines au TNBS**

	Blancs	Héparine C1	Héparine C2
Solution Héparine	0	500	375
TB	500	0	125
TNBS	500	500	500

15           Blancs : échantillons sans héparine

Les dosages incluent toujours les échantillons de référence ND<sub>100</sub>-HEP (héparine totalement N-désulfatée).

Le temps est décompté dès l'ajout de TNBS (les ajouts sont faits à intervalles réguliers). La réaction se fait à température ambiante. On prélève à différents temps des quantités de 100 µl qui sont aussitôt diluées par ajout de 800 µl de TB. La DO est lue à 420 nm et les valeurs sont multipliées par 9 pour les calculs. On soustrait aux DO obtenues pour les échantillons d'héparine, la valeur des DO des blancs prélevés aux temps correspondants. L'évolution des blancs est linéaire (Figure 1).

Les paramètres cinétiques des héparines sont calculés de manière à pouvoir déterminer la DO théorique (DO<sub>max</sub>) pour 100% d'achèvement de la réaction de

dosage. La concentration en TNBS étant très supérieure à la concentration en  $\text{NH}_2$ , cette première peut être assimilée à une constante (on l'exprimera par  $[\text{TNBS}]$ ) et la cinétique est alors de type pseudo-ordre 1. La vitesse  $V$  de la réaction de dosage peut être considérée comme étant directement proportionnelle à la concentration des

5  $\text{NH}_2$  :

$$V = k \cdot [\text{TNBS}] \cdot [\text{NH}_2]$$

L'évolution des DO suit la loi suivante:

$$\text{DO} = \text{DO}_{\text{max}} \cdot (1 - e^{-kt})$$

10 Il est possible de linéariser cette équation sous la forme  $Y = a + b \cdot t$ , en calculant le logarithme de la différence entre une  $\text{DO}_{\text{max}}$  théorique et la DO expérimentale au temps  $t$ . On a alors :

$Y = \ln(\text{DO}_{\text{max}} - \text{DO}t)$ , et en traçant  $Y = f(t)$  on obtient une droite avec les données expérimentales transformées dont l'ordonnée à l'origine et la pente sont

15 respectivement :

$$a = \ln(\text{DO}_{\text{max}}) \quad \text{et} \quad b = -k.$$

Les données expérimentales sont donc transformées (Tableau 2) en utilisant une  $\text{DO}_{\text{max}}$  théorique dont on ajuste la valeur de manière à obtenir le meilleur

20 coefficient de détermination pour la droite  $Y = f(t)$  et les plus petits écarts entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées qu'il est possible de calculer et de visualiser par la superposition de la courbe théorique aux données expérimentales (Figure 2). Cet ajustement est très facile à réaliser en ayant entré les données dans une feuille de calcul modèle (tableur Microsoft® Excel).

**Tableau 2 : Transformation des données expérimentales du dosage de ND<sub>100</sub>-HEP**

Temps (min)	10	20	55	120	DOmaxTheo
DOt (exp.)	2,880	4,086	4,437	4,437	4,4444
Ln(DOmaxTheo – DOt)	0,448	-1,026	-4,906	-4,906	

Les paramètres calculés sont les suivants :

**5 Tableau 3 : Paramètres cinétiques pour le dosage de ND<sub>100</sub>-HEP par le TNBS**

b (pente)	a (origine)	r <sup>2</sup>
-0,11685433	1,4825799	0,9968
DOMax = 4,404		

t <sub>1/2</sub> =	5,93 min
t <sub>99%</sub> =	39,41 min

On effectue ces calculs pour les différents échantillons ND-HEP utilisés dans un dosage afin de déterminer le DOMax calculé pour chacun d'eux. Pour certains, en fonction de la concentration en NH<sub>2</sub> effectivement présente, les cinétiques ne sont pas totalement achevées en une heure. La méthode revêt alors tout son intérêt 10 puisqu'elle permet de faire passer une courbe théorique par les points expérimentaux et de calculer le DOMax que l'on aurait eu si tous les NH<sub>2</sub> avaient réagi.

En supposant que l'on a le même coefficient d'extinction molaire pour tous les composés il est possible de déterminer le pourcentage de NH<sub>2</sub> selon la formule :

15

$$\%NH_2 = \frac{\text{Conc. ND}_{100} - \text{HEP}}{\text{DO ND}_{100} - \text{HEP}} \times \frac{\text{DOx}}{\text{Conc. X}}$$

Les valeurs de DOMax et le %NH<sub>2</sub> de ND<sub>30</sub>-HEP et ND<sub>63</sub>-HEP sont présentés pour exemple (Tableau 4).

**Tableau 4 : Calcul du %NH<sub>2</sub> pour deux dérivés ND-HEP**

Nom	C (mg/ml)	DOMax	% NH <sub>2</sub>
ND <sub>100</sub> -HEP	0,835	4,404	100 %
ND <sub>63</sub> -HEP	1,68	5,619	63,4 %
ND <sub>30</sub> -HEP	2,43	3,860	30,1 %

**Exemple 2 : Mise en évidence de l'augmentation de la solubilité aqueuse de certains principes actifs insolubles dans l'eau**

Des essais d'incorporation de principes actifs ont été réalisés par mise en agitation de la molécule à tester, à l'état solide, dans une solution d'héparine hydrophobisée par de l'acide cholique, l'héparine ayant été N-désulfatée à 19%, et préparée sous forme de sel de calcium (HEP19CHO), à la concentration Cp (mg/ml) pendant plusieurs jours. Le principe actif non solubilisé est éliminé après filtration des solutions sur une membrane ayant une porosité de 0.45 µm. La quantité de principe actif en solution est alors déterminée. Ayant déterminé les quantités solubilisées dans l'eau et celles dissoutes dans les domaines hydrophobes, il est alors possible de calculer un coefficient de partage Domaines hydrophobes / Eau que l'on appelle Log P' par analogie au Log P.

En effet, la solubilité relative de molécules entre une phase huileuse et une phase aqueuse est décrite par le coefficient de partage P qui représente la répartition des molécules entre deux solvants, généralement l'eau et l'octanol. On préfère souvent employer son logarithme, log P. Ainsi log P > 0 pour les molécules hydrophobes et log P < 0 pour les molécules hydrophiles. Ainsi, lorsque Log P est égal à 3, cela signifie que le rapport des solubilités de l'actif dans l'eau et dans la phase huileuse est égal à 1000. Il en est de même pour Log P' qui exprime le rapport des solubilités de l'actif dans l'eau et dans la solution d'héparine hydrophobisée.

Les molécules suivantes ont été testées (voir tableau 5).

**Tableau 5 : Incorporation de molécules hydrophobes dans une héparine hydrophobisée par l'acide cholique (19 % de N- Désulfatation à Cp = 8 mg/ml) sous forme de sel de calcium (HEP19CHO)**

<b>Principe actif</b>	<b>Quantité de principe actif solubilisée (µmol / g)</b>	<b>Quantité de principe actif solubilisée (mg / g)</b>	<b>Log P'</b>
Yellow OB	14	3,75	5
Itraconazole	180	130	3,32
Progestérone	242	76	1,89
Nifédipine	260	90	2,25
Carbamazépine	524	124	1,0

5 Ces résultats montrent que la présence de molécules d'héparine ayant des groupements hydrophobes permet d'accroître significativement la solubilité de molécules faiblement solubles dans l'eau. Parmi les molécules testées, la carbamazépine est celle qui présente le plus d'affinité pour les domaines hydrophobes. Des molécules telles que l'itraconazole ou la nifédipine, dont la solubilité dans l'eau est extrêmement faible, présentent une solubilité accrue  
10 lorsqu'elles se trouvent incorporées dans l'héparine hydrophobisée, ce qui est d'autant plus intéressant qu'elles sont actives à faible dose. Ainsi, la nifédipine et l'itraconazole sont respectivement de 175 et plus de 2000 fois plus solubles dans une solution d'héparine hydrophobisée que dans l'eau.

15 Ces résultats montrent que les domaines hydrophobes de l'héparine modifiée par l'acide cholique permettent d'incorporer des principes actifs hydrophobes et d'augmenter considérablement leur solubilité dans l'eau.

**Exemple 3 : Incorporation de principes actifs dans une solution aqueuse d'héparine hydrophobisée**  
20

L'incorporation de principes actifs a été réalisée essentiellement par la méthode de dissolution. Dans cette méthode, le composé à incorporer est placé sous

forme solide dans un tube contenant de l'eau ou une solution colloïdale d'héparine hydrophobisée, à la concentration  $C_p$  (mg/ml).

Le mélange est effectué sous agitation à température ambiante pendant différents temps. Le composé à incorporer demeure en concentration saturante dans le milieu. A l'issue de la période d'incorporation, les tubes sont soumis à une étape de centrifugation et les surnageants sont filtrés sur des filtres à  $0,45\ \mu\text{m}$  et dosés. Des solutions témoins (eau ou héparine non hydrophobisée) sont traitées de la même façon.

La quantité de principe actif incorporé dans les différents milieux est quantifiée par HPLC et/ ou par mesure de l'absorbance en UV.

La filtration et la détermination de la quantité dissoute dans l'eau permettent ensuite d'accéder à la quantité de principe actif incorporée dans les domaines hydrophobes des héparines hydrophobisées conformes à l'invention, et au calcul du  $\text{Log } P'$  tel que défini précédemment.

Ainsi, l'incorporation est exprimée en milligramme de principe actif par gramme de polymère (mg/g P) ou en micromole de principe actif par gramme de polymère ( $\mu\text{mol/g P}$ ). Ce taux d'incorporation est calculé en effectuant le rapport entre la concentration du principe actif en solution et la concentration du polymère. Il est important de prendre en considération la quantité de principe actif solubilisée dans des témoins tels que l'eau ou une solution d'héparine non hydrophobisée (héparine native ou échantillon N-désulfaté). La différence de concentration en principes actifs dans l'eau et dans une solution d'héparine hydrophobisée représente la quantité de principe actif effectivement présente au sein des microdomaines hydrophobes formés par le regroupement de résidus d'acide cholique.

25

#### **a) carbamazépine**

La figure 3 représente le taux d'incorporation de carbamazépine dans les deux solutions témoins (héparine non modifiée et eau) et dans une solution à 8 mg /ml d'héparine hydrophobisée par l'acide cholique dont le taux de N-Désulfatation est de 19 % ( $\text{HEP}_{19}\text{ CHO}$ ) conformément à la présente invention.

30

Ces résultats montrent que la concentration du principe actif en solution dans l'eau ou en présence d'héparine est très nettement inférieure à la concentration dans

une solution comprenant de l'héparine hydrophobisée conforme à l'invention. Dans cet exemple, le gain en solubilité par rapport à l'eau dépasse les 500%.

On peut déterminer la concentration de carbamazépine présente dans les domaines hydrophobes (559,9 mg/ml) en soustrayant à la concentration de carbamazépine dans la solution HEP<sub>19</sub>CHO la concentration du principe actif présente dans la phase aqueuse. Le taux d'incorporation dans les domaines hydrophobes est alors déterminé en divisant la concentration en principe actif incorporée par la concentration massique du polymère en solution. On obtient ainsi pour la carbamazépine dans HEP<sub>19</sub>CHO selon les conditions mentionnées en Erreur ! Source du renvoi introuvable. un taux d'incorporation de 70 mg/g P.

#### **b) Autres principes actifs hydrophobes**

Des essais d'incorporation dans des conditions semblables à celles décrites dans l'exemple 3 pour la carbamazépine (CBZ) ont été réalisés pour deux autres principes actifs hydrophobes l'Itraconazole (ITR) et la Nifédipine (NIF).

La figure 4 représente les quantités de CBZ, NIF et ITR présentes dans l'eau et dans les domaines hydrophobes d'une héparine hydrophobisée par l'acide cholique à un taux de N-désulfatation de 19 % (HEP<sub>19</sub>CHO) après 6 jours de période d'incorporation. Dans ces conditions, la quantité de CBZ en solution a été décuplée, celles de NIF et ITR ont été accrues de plus de 175 et 2000 fois respectivement. Les coefficients de partage de ces trois molécules sont supérieurs ou égaux à 1 induisant une très forte affinité en faveur des domaines hydrophobes (Figure 5).

#### **Exemple 4 : Influence du contre-ion**

25

Il a également été mis en évidence une différence de pouvoir solubilisant des domaines hydrophobes en fonction de la nature du contre-ion de la partie héparinique des vecteurs. Ainsi, dans le cas de la nifédipine, les cations bivalents permettent l'incorporation de davantage de principe actif qu'un cation monovalent tel que le sodium (Figure 6).

30

Dans le cas des formes sodiques, les charges négatives de l'héparine sont individualisées. La neutralisation de ces charges par un cation bivalent favorise le

regroupement des chaînes hydrophiles ce qui permet un assemblage plus aisé des domaines hydrophobes. La mise en place des domaines hydrophobes est donc favorisée par la présence de cations bivalents. Ainsi on peut supposer que  $Mg^{2+}$  induit un arrangement différent de la couronne hydrophile qui se traduit par un impact sur la structure des domaines les conduisant soit à se rapprocher, soit à faciliter la formation de domaines plus gros susceptibles d'accueillir davantage de molécules hôtes.

Pour de plus faibles quantités de Nifédipine, on constate une forte incorporation du principe actif dans le cas de  $HEP_{30}CHO-Ca$  par rapport à  $HEP_{30}CHO-Na$ .

**Exemple 5 : Détermination de l'efficacité de couplage entre l'héparine et l'acide cholique (HEPCHO).**

Afin d'évaluer l'efficacité (ou le taux) du couplage, le nombre de fonctions amine résiduelles a été quantifié à l'issue de la réaction d'hydrophobisation par l'acide cholique. La demanderesse a utilisé une méthode permettant de coupler le TNBS sur les fonctions amine des HEPCHO puis d'isoler les composés obtenus et de quantifier ultérieurement leur absorption.

**Marquage d'HEPCHO au TNBS**

Le mode opératoire employé est adapté du protocole de dosage au TNBS en utilisant des concentrations plus élevées en TNBS et des quantités d'héparine suffisantes afin de permettre le traitement du produit final en vue de sa caractérisation.

La réaction a été effectuée sur  $HEP_{30}CHO$  (héparine N-désulfatée à un taux de 30% puis hydrophobisée par l'acide cholique),  $HEP_{63}CHO$  (héparine N-désulfatée à un taux de 63% puis hydrophobisée par l'acide cholique) ainsi que sur les héparines N-désulfatées d'origine respectives  $ND_{30}-HEP$  et  $ND_{63}-HEP$ .

Le mode opératoire est très simple. Il consiste à faire réagir du TNBS sur une quantité d'environ 100 mg d'HEPCHO ou de ND-HEP dissoute dans du tampon borate à pH 10. A la fin de la réaction, l'aspect des solutions est en accord avec



l'intensité des marquages attendus : les HEPCHO sont oranges et les ND-HEP rouges (ND<sub>63</sub>-HEP est particulièrement rouge intense).

Le contenu des tubes est alors mis à dialyser pour purification. En effet, il faut s'assurer de l'élimination totale de l'acide picrique en excès. Les composés  
5 obtenus sont des dérivés de type trinitrophénylamine désignés ND-HEP-TNP et HEPCHO-TNP. Suite à cette étape de purification, le volume des solutions est précisément ajusté pour une mesure de la densité optique à 420 nm. Par la suite, les échantillons sont concentrés et lyophilisés.

#### 10 **Caractérisation du marquage et détermination de l'efficacité de couplage**

L'absence d'acide picrique résiduel dans les quatre échantillons a d'abord été vérifiée. Des solutions aqueuses d'héparines marquées au TNBS ont donc été injectées par HPLC. Des solutions témoins contenant de l'acide picrique ou des  
15 mélanges d'héparine-TNP / acide picrique ont également été injectées. Les chromatogrammes HPLC montrent l'absence d'acide picrique résiduel dans tous les échantillons d'HEPCHO-TNP et de ND-HEP-TNP.

L'efficacité de couplage de l'acide cholique sur les fonctions NH<sub>2</sub> a été déterminée selon deux méthodes : mesure des DO à la fin de l'étape de dialyse et analyse à partir du produit fini lyophilisé.

20 A l'issue de la dernière dialyse, les volumes des solutions purifiées d'héparines marquées au TNBS ont été précisément ajustés à 50 ml pour une lecture de la DO à 420 nm. Les solutions de type ND-HEP-TNP, qui sont plus fortement colorées, ont fait l'objet d'une dilution au 1/10<sup>e</sup> en raison de leur trop forte coloration. Cette première évaluation de l'efficacité de couplage est basée sur un postulat qui  
25 attribue 63% de titre en NH<sub>2</sub> au produit ND<sub>63</sub>-HEP-TNP à partir duquel on déduit les teneurs en NH<sub>2</sub> des autres composés en fonction de leurs rapports DO sur concentration en héparine-TNP (tableau 6).

**Tableau 6 : Evaluation du pourcentage d'amine et de l'efficacité du couplage de l'acide cholique sur des héparines-TNP, à l'issue de la réaction au TNBS**

Nom	Pesées* (mg)	Conc (mg/ml)	DO(420nm)	DO/C	% NH <sub>2</sub>	Efficacité
ND <sub>63</sub> -HEP-TNP	115,8	0,232	0,935	4,04	63%	93,5%
HEP <sub>63</sub> CHO-TNP	103	2,06	0,537	0,26	4,07%	
ND <sub>30</sub> -HEP-TNP	105	0,210	0,457	2,18	33,96%	81,0%
HEP <sub>30</sub> CHO-TNP	102,9	2,06	0,852	0,41	6,46%	

\*poids initial d'héparine engagé dans la réaction de couplage

5           Ainsi, sur la base de ce postulat, on trouve un pourcentage de fonctions amine primaire d'environ 34% pour le composé ND<sub>30</sub>-HEP-TNP. Cette valeur est assez proche de la valeur déterminée par la méthode colorimétrique au TNBS sur l'échantillon ND<sub>30</sub>-HEP (30,1%) ce qui permet d'accepter les valeurs calculées pour HEP<sub>63</sub>CHO-TNP et HEP<sub>30</sub>CHO-TNP. La méthode indique aussi qu'environ 94% des  
10   fonctions NH<sub>2</sub> de ND<sub>63</sub>-HEP ont été effectivement substituées par l'acide cholique. La réaction de couplage sur ND<sub>30</sub>-HEP n'a permis d'affecter qu'environ 81% des fonctions amine initialement présentes.

La seconde méthode d'évaluation de l'efficacité de couplage de l'acide cholique implique la réalisation de solutions à partir des quatre échantillons lyophilisés, suivie d'une lecture de la densité optique à 420 nm. Les calculs sont  
15   différents et prennent en compte la détermination de la concentration molaire en NH<sub>2</sub> d'après la DO et un coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon = 4700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . On calcule alors un rapport entre cette concentration molaire et la concentration massique corrigée par la contribution massique de la substitution par le groupe TNP ( $n/C_{\text{Cor}}$ ).  
20   Connaissant le ratio n/C théorique de l'héparine ND<sub>100</sub>-HEP ( $n/C = 1,49 \cdot 10^{-3} \text{ mol/g}$ ), il est alors possible de calculer le pourcentage de NH<sub>2</sub> des échantillons (tableau 7). Le calcul de l'efficacité de couplage prend notamment en compte le nombre de résidus modifiés par l'acide cholique ainsi que la contribution massique apportée par ces groupements.

**Tableau 7 : Evaluation du pourcentage d'amine et de l'efficacité du couplage de l'acide cholique sur des héparines-TNP isolées et remises en solution**

Nom	Conc (mg/ml)	DO (420nm)	Nb mol/l (n) NH <sub>2</sub>	n/C <sub>Cor</sub>	%NH <sub>2</sub>	Efficacité
ND <sub>63</sub> -HEP-TNP	0,037	0,141	$3,00 \cdot 10^{-5}$	$9,72 \cdot 10^{-4}$	65,2%	91,16%
HEP <sub>63</sub> CHO-TNP	0,250	0,074	$1,57 \cdot 10^{-5}$	$6,38 \cdot 10^{-5}$	4,3%	
ND <sub>30</sub> -HEP-TNP	0,112	0,253	$5,38 \cdot 10^{-5}$	$5,35 \cdot 10^{-4}$	35,9%	79,15%
HEP <sub>30</sub> CHO-TNP	0,950	0,419	$8,91 \cdot 10^{-5}$	$9,57 \cdot 10^{-5}$	6,4%	

5 Le pourcentage de fonctions amine ainsi déterminé est également assez proche des valeurs trouvées par le dosage colorimétrique effectué sur les échantillons ND-HEP. De même, cette méthode de détermination indirecte donne des efficacités de couplage de l'acide cholique sur les héparines N-désulfatées proches de celles déterminées par la méthode précédente (à l'issue de la purification par dialyse).

10 A partir de ces dernières données, il est possible d'avoir une idée de la structure des héparines modifiées selon le raisonnement suivant :

Si l'on considère que l'héparine utilisée présente en moyenne par motif glucosamine :

- 2% de fonctions NH<sub>2</sub> (dosage colorimétrique au TNBS) ;
- 15 - 15 à 16% de fonctions N-acétyl (spectres H-RMN) ;
- 83% de fonctions N-sulfate (par différence).

Le motif glucosamine de notre référence ND<sub>100</sub>-HEP est à "100% de NH<sub>2</sub>" (c'est sur cette base que sont déterminés tous les autres % de NH<sub>2</sub> des ND-HEP<sub>x</sub>), soit en réalité environ 15% de fonctions N-acétyl et 85% de fonctions NH<sub>2</sub>.

20 Ainsi, les motifs glucosamine des composés HEP<sub>63</sub>CHO et HEP<sub>30</sub>CHO ont la structure théorique suivante (tableau 8).

**Tableau 8 : Structures des motifs glucosamine de deux héparines  
hydrophobisées par l'acide cholique**

		HEP <sub>63</sub> CHO	HEP <sub>30</sub> CHO
%NH <sub>2</sub> par rapport à ND <sub>100</sub> -HEP		4,3%	6,4%
Substituant sur G-2	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	3,7%	5,4%
	-NH-cholyl	51,7%	25,1%
	-NH-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	29,6%	54,5%
	-NH-CO-CH <sub>3</sub>	15%	15%

Le pourcentage correspondant à -NH-cholyl représente le nombre de  
5 molécules d'acide cholique greffées pour 100 unités disaccharidiques de l'héparine.

**Exemple 6 : Mise en évidence de l'augmentation de l'absorption intestinale en  
présence d'héparine hydrophobisée.**

10 La demanderesse a mis en évidence sur un modèle animal, la modification de  
l'absorption intestinale de certains principes actifs peu hydrosolubles en présence  
d'héparine hydrophobisée par de l'acide cholique, l'héparine ayant été N-désulfatée à  
30%, et préparée sous forme de sel de magnésium (HEP30CHO).

Le modèle employé est le sac intestinal éversé de rat. Il s'agit d'une méthode  
15 *ex vivo* sur une partie d'organe isolé (Barthe *et al.* 1998, 1999). Pour ce faire,  
l'intestin grêle de rat adulte est prélevé puis retourné au moyen d'une tige de verre.  
Des sacs d'environ 2 cm de long sont réalisés en fermant hermétiquement les  
extrémités de segments intestinaux. Lesdits sacs présentent alors le côté muqueux  
comportant les villosités intestinales à l'extérieur. Ces sacs sont mis à incuber dans  
20 un milieu de culture cellulaire oxygéné à 37 °C et riche en vitamines et nutriments (le  
TC 199) de façon à augmenter la survie des cellules intestinales. Dans ces conditions,  
la muqueuse intestinale est physiologiquement fonctionnelle puisque les cellules  
consomment le glucose du milieu de culture et produisent un abondant mucus au  
cours de l'expérience. Le principe actif dont on veut mesurer l'absorption est placé  
25 dans une solution à l'extérieur du sac. Les sacs sont prélevés à différents temps et la

quantité de principe actif qui est absorbée par la muqueuse intestinale est quantifiée à l'intérieur des sacs par HPLC.

Deux expériences ont été menées sur ce modèle en présence de nifédipine vectorisée par l'héparine hydrophobisée conforme à l'invention. Etant donné la très faible solubilité de la nifédipine en solution aqueuse, les solutions témoins ont été réalisées à partir de nifédipine solubilisée dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) et ajoutée au milieu de culture cellulaire (soit 0.1 % de DMSO au maximum) de façon à obtenir une solution homogène de nifédipine.

Pour la préparation des milieux contenant de l'héparine hydrophobisée, une quantité de polymère correspondant à 20-25 µg/ml de principe actif est dissoute dans l'eau.

L'absorption de la Nifédipine a été quantifiée au bout de 30, 60 et 90 minutes d'incubation.

Les résultats de cette expérience sont représentés sur la figure 7.

La figure 7 représente l'absorption de Nifédipine par la muqueuse intestinale en fonction de sa vectorisation ou non. La différence de vitesse d'absorption entre la Nifédipine vectorisée par HEP<sub>30</sub>CHO et une solution comprenant ce principe actif et du DMSO est manifeste.

Ainsi, pour des concentrations de nifédipine voisines, vectorisée par l'héparine ou solubilisée par le DMSO, la demanderesse a pu mettre en évidence un véritable effet promoteur de l'absorption dans le cas de l'héparine hydrophobisée. En effet, la vitesse d'absorption de la nifédipine vectorisée par le polymère est nettement supérieure à celle de la nifédipine maintenue en solution grâce au DMSO. Sans l'artifice de l'augmentation de la solubilité de la nifédipine par le DMSO, les quantités de ce principe actif dans les sacs témoins auraient été très faibles. L'effet promoteur de l'absorption est donc considérablement supérieur à ce que traduit la figure 7.

Ces résultats permettent d'envisager l'intensification de l'absorption intestinale et par conséquent l'augmentation de la biodisponibilité *in vivo* de la nifédipine et d'autres principes actifs vectorisés par ce type de polymère.

Ainsi, la présente invention permet de fournir un nouveau type de vecteur permettant d'augmenter significativement la solubilité et l'absorption intestinale de

principes actifs lipophiles faiblement absorbés d'ordinaire par les cellules de la muqueuse intestinale, tels que les médicaments appartenant à la classe des anticancéreux ou des anti-inflammatoires par exemple.

- 5 De plus, les nanoparticules conformes à l'invention peuvent être intégrées facilement dans un support galénique traditionnellement utilisé pour l'administration par voie orale de médicaments, tel que des granules, des microgranules, des comprimés, des gélules ou solutions buvables.

### Bibliographie

- Akiyoshi, K., S. Deguchi, N. Moriguchi, S. Yamaguchi et J. Sunamoto (1993). *Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water. Formation and characteritics of nanoparticles.* Macromolecules, 26, 3062-3068.
- Barthe, L., J. F. Woodley et G. Houin (1999). *Gastrointestinal absorption of drugs : methods and studies.* Fundamental and Clinical Pharmacology, 13, 154-168.
- Barthe, L., J. F. Woodley, S. Kenworthy et G. Houin (1998). *An improved everted gut sac as a simple and accurate technique to measure paracellular transport across the small intestine.* European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 23, 313-323.
- Desai, M. P., V. Labhasetwar, G. L. Amidon et R. J. Levy (1996). *Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles : effect of particle size.* Pharmaceutical Research, 13, 1838-1845.
- Diancourt F., C. Braud et M. Vert (1996). *Chemical modifications of heparin. II. Hydrophobization of partially N-desulfated heparin.* Journal of bioactive and compatible polymers, 11, 203-218.
- Evin, G. (1978). *Le BOP, nouveau réactif de couplage peptidique. Applications à la synthèse de la Somatostatine et de dérivés solubles de la Pepstatine* A. Nancy, Université de Nancy I: 200.
- Florence, A. T. (1997). *The oral absorption of micro- and nanoparticulates : neither exceptional nor unusual.* Pharmaceutical Research, 14, 259-266.
- Inoue, Y. et K. Nagasawa (1976). *Selective N-desulfation of heparin with dimethyl sulfoxide containing water or methanol.* Carbohydrate Research, 46, 87-95.
- Larhed, A. W., P. Artursson, J. Graasjö et E. Björk (1997). *Diffusion of drugs in native and purified gastrointestinal mucus.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 86, 660-665.
- Nagasawa, K. et Y. Inoue (1974). *Solvolytic desulfation of 2-deoxy-2-sulfoamino-D-glucose and D-glucose 6-sulfate.* Carbohydrate Research, 36, 265-271.
- O'Hagan, D. T. (1996). *The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery.* Journal of Anatomy, 189, 477-482.

Park, K. et R. Robinson (1984). *Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery : method to study bioadhesion*. International Journal of Pharmaceutics, 19, 107-127.

Ponchel, G., M. J. Montisci, A. Dembri, C. Durrer et D. Duchêne (1997).  
5 *Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 44, 25-31.

Snyder, S. L. et P. Z. Sobocinski (1975). *An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines*. Analytical Biochemistry, 64, 284-288.



## REVENDICATIONS

1. Dérivé amphiphile d'héparine formé à partir d'une héparine au moins partiellement N-désulfatée et d'au moins un acide biliaire, comprenant une ou  
5 plusieurs molécules d'acide biliaire greffées sur la molécule d'héparine par une liaison amide formée entre la fonction acide carboxylique terminale de l'acide biliaire et une fonction amine primaire de l'héparine, originellement présente dans l'héparine ou résultant de la N-désulfatation, caractérisé en ce que le nombre de  
10 molécules d'acide biliaire greffées pour 100 unités disaccharidiques de l'héparine est compris entre environ 15 et environ 80.
2. Dérivé amphiphile d'héparine selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nombre de molécules d'acide biliaire greffées pour 100 unités disaccharidiques de l'héparine est compris entre environ 20 et environ 60.  
15
3. Dérivé amphiphile d'héparine selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'acide biliaire est choisi parmi l'acide cholique, l'acide désoxycholique, l'acide lithocholique, l'acide cholanique et l'acide chénodéoxycholique, ainsi que leurs mélanges.  
20
4. Dérivé amphiphile d'héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est préparé sous forme de sel de calcium, de magnésium ou de sodium.
- 25 5. Dérivés amphiphiles de l'héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisés en ce qu'ils sont capables de s'assembler spontanément en milieu aqueux pour former des nanoparticules.
- 30 6. Nanoparticules pouvant être formées à partir du dérivé amphiphile d'héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

7. Nanoparticules selon la revendication 6, caractérisées en ce que leur taille moyenne est comprise entre 10 nm et 1  $\mu$ m.
8. Nanoparticules selon la revendication 6 ou 7, caractérisées en ce qu'elles  
5 contiennent un ou plusieurs domaines hydrophobes internes et une surface externe hydrophile.
9. Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisées en ce qu'elles contiennent en outre un ou plusieurs principes actifs hydrophobes dissous  
10 dans leur domaines internes hydrophobes.
10. Nanoparticules selon la revendication 9, caractérisées en ce que lesdits principes actifs portent en outre un ou plusieurs groupements polaires.
11. Nanoparticules selon la revendication 9 ou 10, caractérisées en ce que lesdits principes actifs sont choisis parmi les anti-inflammatoires, les antifongiques, les inhibiteurs des canaux calciques et les anti-cancéreux.  
15
12. Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, comme vecteurs de principes actifs pouvant être administrés par voie orale.  
20
13. Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, comme vecteurs de principes actifs permettant d'augmenter l'absorption de ceux-ci par la muqueuse intestinale.  
25
14. Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, comme vecteurs de principes actifs permettant la libération progressive de ceux-ci au niveau de la muqueuse intestinale.
15. Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 6 à 14, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme lyophilisée.  
30

16. Suspension colloïdale en milieu aqueux contenant les nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 6 à 14.

17. Composition pharmaceutique comprenant les nanoparticules selon l'une  
5 quelconque des revendications 9 à 14, associées à au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

18. Composition pharmaceutique selon la revendication 17, dans laquelle l'excipient est choisi pour permettre une administration de principes actifs par voie orale.

10

19. Composition pharmaceutique selon la revendication 18, sous forme de granules, microgranules, comprimés, gélules ou solutions buvables.

15

20. Procédé de préparation du dérivé amphiphile d'héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, comprenant la N-désulfatation au moins partielle d'une héparine, puis une étape de couplage qui consiste à faire réagir au moins une fonction amine primaire de l'héparine, originellement présente ou résultant de la N-désulfatation, avec la fonction acide carboxylique terminale, éventuellement sous forme activée, d'au moins un acide biliaire.

20

21. Procédé de préparation du dérivé amphiphile d'héparine selon la revendication 20, caractérisé en ce que l'agent de couplage utilisé pour activer la fonction carboxylique terminale de l'acide biliaire est choisi parmi l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxy-tris(diméthylamino)phosphonium (BOP), l'hexafluorophosphate  
25 de benzotriazolyl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium (PyBOP) et le l'hexafluorophosphate de bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium (PyBroP).

22. Procédé de préparation des nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 9 à 14, caractérisé en ce que le principe actif est incorporé dans  
30 lesdites nanoparticules par dissolution directe sous agitation, par dialyse, par émulsion huile/eau, ou par évaporation de solvant.

**23.** Utilisation des nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 9 à 14, pour augmenter la solubilité d'un principe actif hydrophobe en milieu aqueux.

1/4

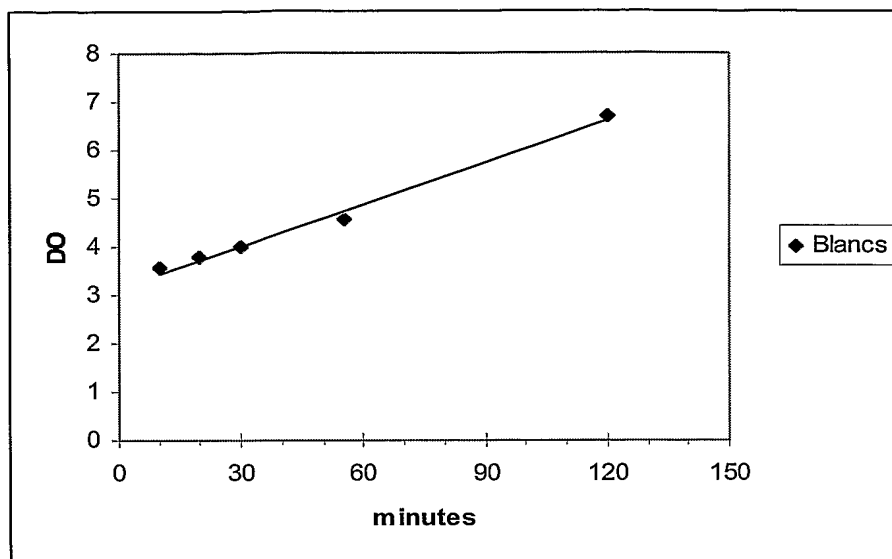


FIGURE 1

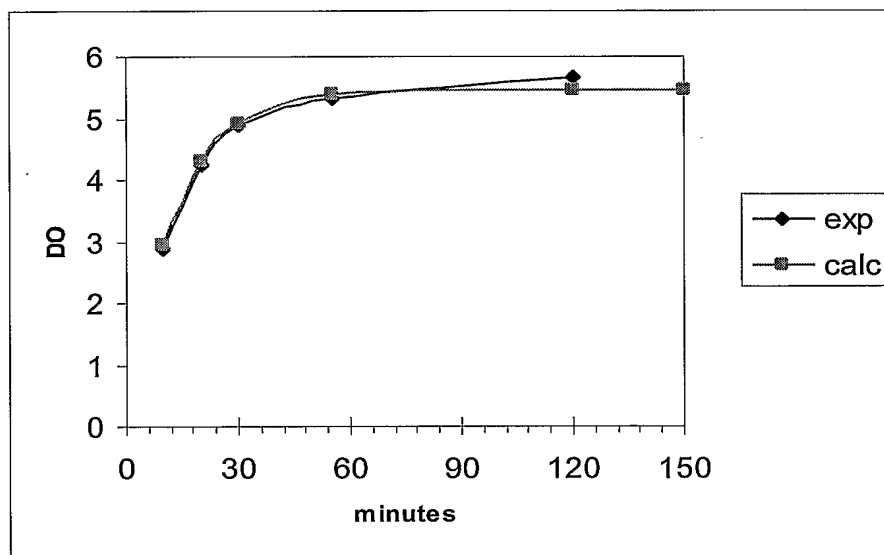


FIGURE 2

2/4

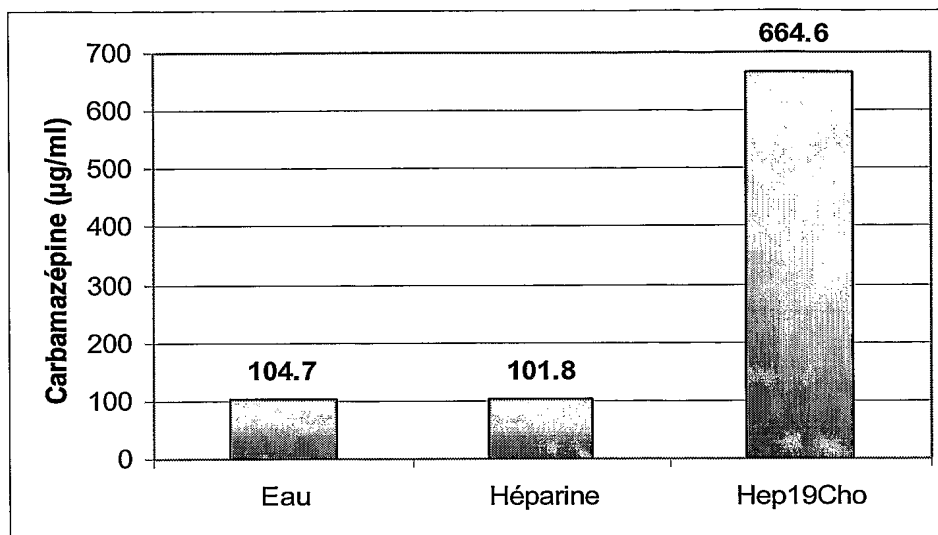


FIGURE 3

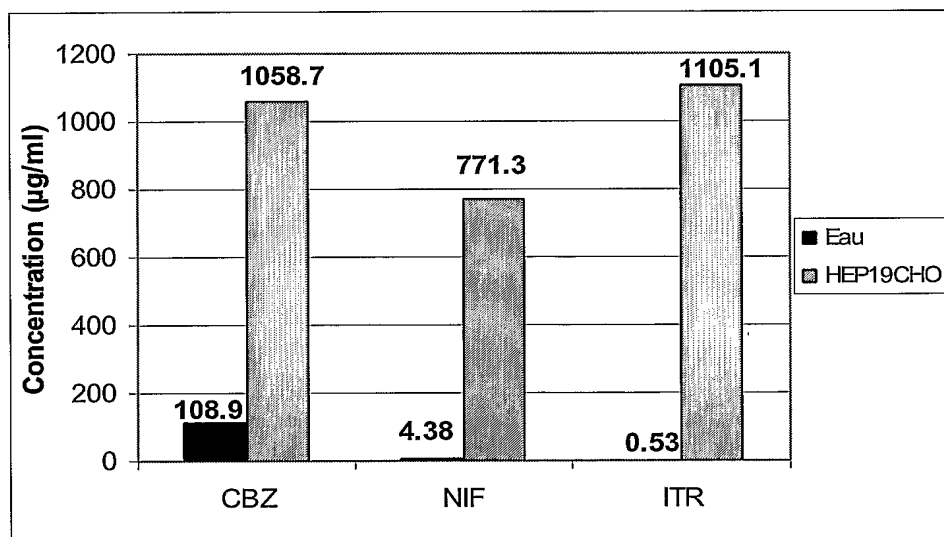


FIGURE 4

3/4

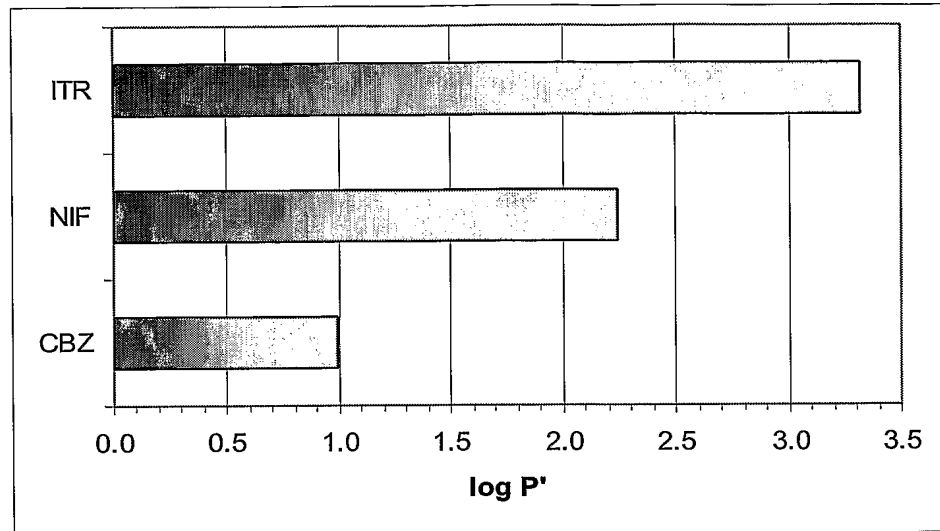


FIGURE 5

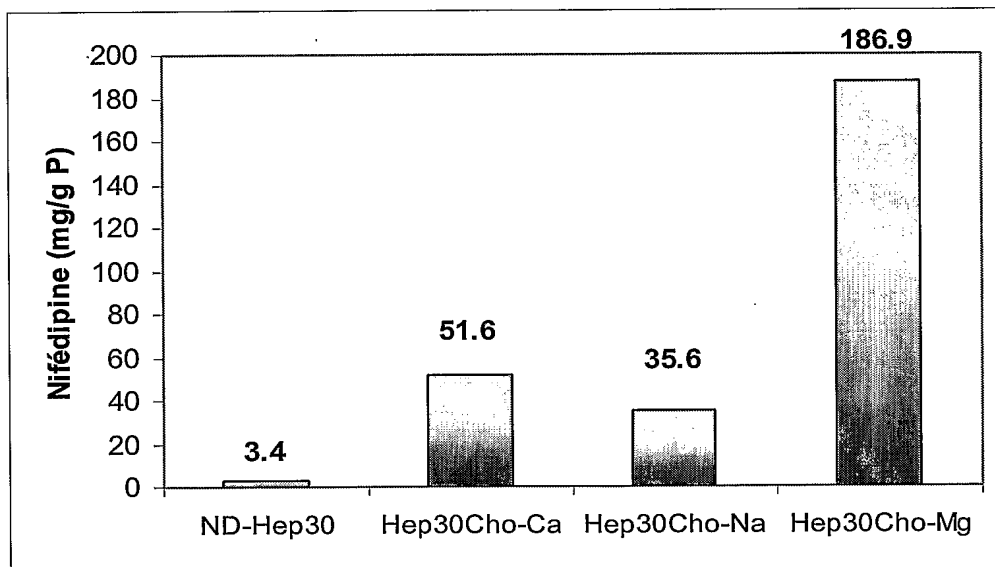


FIGURE 6

4/4

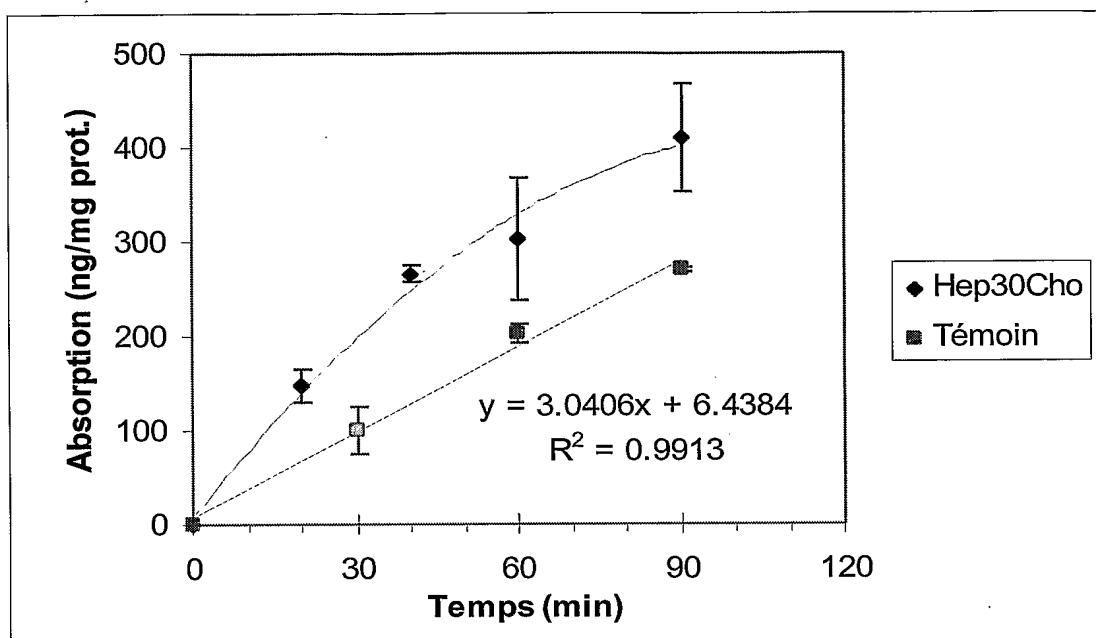


FIGURE 7



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/003285

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08B37/10 A61K9/10 A61K9/14 A61K47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DIANCOURT F. ET AL.: "Chemical Modifications of Heparins. II. Hydrophobization of Partially N-Desulfated Heparin" JOURNAL OF BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS, vol. 11, 1996, pages 203-218, XP008047382 cited in the application abstract page 207, paragraph 2 page 208 - page 209 page 216, line 22 - line 28 page 217, line 1 - line 10 ----- -/--</p>	<p>1-14, 16-20, 22,23</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 May 2005

Date of mailing of the international search report

02/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/003285

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2002/013292 A1 (BYUN YOUNGRE ET AL) 31 January 2002 (2002-01-31) figures 1A, 1B, 1C paragraph '0003! paragraph '0006! paragraphs '0021! - '0030! paragraph '0066! paragraphs '0084! - '0089! examples -----	1-23
A	WO 99/61481 A (MEDIPLEX CORP KOREA) 2 December 1999 (1999-12-02) page 3, line 15 - line 19 page 4, line 3 - line 17 page 6, line 14 - line 19 page 7, line 20 - line 21 page 8, line 6 - line 11 example 1 example 3 example 4 claims -----	1-3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/003285

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002013292	A1	31-01-2002	
		AU 3735899 A	13-12-1999
		DE 19981169 T0	16-11-2000
		GB 2342357 A , B	12-04-2000
		JP 3541007 B2	07-07-2004
		JP 2002516355 T	04-06-2002
		WO 9961481 A1	02-12-1999
		US 6245753 B1	12-06-2001
		US 2004220143 A1	04-11-2004
		US 2002010153 A1	24-01-2002
WO 9961481	A	02-12-1999	
		AU 3735899 A	13-12-1999
		DE 19981169 T0	16-11-2000
		GB 2342357 A , B	12-04-2000
		JP 3541007 B2	07-07-2004
		JP 2002516355 T	04-06-2002
		WO 9961481 A1	02-12-1999
		US 6245753 B1	12-06-2001
		US 2004220143 A1	04-11-2004
		US 2002010153 A1	24-01-2002
		US 2002013292 A1	31-01-2002

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2004/003285

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C08B37/10 A61K9/10 A61K47/36

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C08B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DIANCOURT F. ET AL.: "Chemical Modifications of Heparins. II. Hydrophobization of Partially N-Desulfated Heparin" JOURNAL OF BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS, vol. 11, 1996, pages 203-218, XP008047382 cité dans la demande abrégé page 207, alinéa 2 page 208 - page 209 page 216, ligne 22 - ligne 28 page 217, ligne 1 - ligne 10</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-14, 16-20, 22,23</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 mai 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/06/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mazet, J-F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2004/003285

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>US 2002/013292 A1 (BYUN YOUNGRE ET AL)  31 janvier 2002 (2002-01-31)  figures 1A,1B,1C  alinéa '0003!  alinéa '0006!  alinéas '0021! - '0030!  alinéa '0066!  alinéas '0084! - '0089!  exemples</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-23
A	<p>WO 99/61481 A (MEDIPLEX CORP KOREA)  2 décembre 1999 (1999-12-02)  page 3, ligne 15 - ligne 19  page 4, ligne 3 - ligne 17  page 6, ligne 14 - ligne 19  page 7, ligne 20 - ligne 21  page 8, ligne 6 - ligne 11  exemple 1  exemple 3  exemple 4  revendications</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-3

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2004/003285

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2002013292 A1	31-01-2002	AU 3735899 A	13-12-1999
		DE 19981169 T0	16-11-2000
		GB 2342357 A , B	12-04-2000
		JP 3541007 B2	07-07-2004
		JP 2002516355 T	04-06-2002
		WO 9961481 A1	02-12-1999
		US 6245753 B1	12-06-2001
		US 2004220143 A1	04-11-2004
		US 2002010153 A1	24-01-2002
WO 9961481 A	02-12-1999	AU 3735899 A	13-12-1999
		DE 19981169 T0	16-11-2000
		GB 2342357 A , B	12-04-2000
		JP 3541007 B2	07-07-2004
		JP 2002516355 T	04-06-2002
		WO 9961481 A1	02-12-1999
		US 6245753 B1	12-06-2001
		US 2004220143 A1	04-11-2004
		US 2002010153 A1	24-01-2002
		US 2002013292 A1	31-01-2002